

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592716

研究課題名(和文) マウス舌発生における舌下神経の軸索誘導に働く血管・神経・筋系譜細胞の相互作用

研究課題名(英文) Temporo-spatial interactions among blood vessels, nerve axons and myogenic cells govern the guidance of hypoglossal nerve in mouse tongue primordium

研究代表者

佐藤 かおり (SATO, KAORI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90287772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス舌発生領域における血管・神経網の3次元観察と軸索先端部での遺伝子発現解析に基づき、舌下神経の軸索伸長とガイダンス誘導の分子機構について検討した。胎生9.5-11.5日の血管網と神経網の立体観察では、鰓弓内の末梢血管網を明瞭に識別できるとともに、舌下神経を含む脳神経軸索の起始から先端までを辿ることができた。舌下神経軸索は舌筋前駆細胞と接触しながら伸長し、その伸長経路は先行する舌筋前駆細胞の移住経路に重なること、軸索先端部周囲での発達した微小血管網が明らかになった。舌下神経の軸索誘導には、血管内皮細胞と舌筋前駆細胞からのCxcl12/Cxcr4シグナルが働いていると推察された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the guidance mechanism of growing hypoglossal nerve axons in mouse tongue development. 3D reconstruction was conducted using 150-600 serial sections. All serial sections, which were obtained from ICR mouse embryos at E9.5-11.5, were dual-immunolabeled with Pecam1, Desmin or Pgp9.5-Gap43 antibodies. The achieved 3D reconstructs warranted superior positional accuracy to trace the long-range connectivity of blood vessels and individual cranial nerve axons. The hypoglossal nerve axons, which uniquely underwent long-range migration toward tongue primordium, were in close contact with tongue myogenic cells that originated from the occipital somites, and the blood capillaries were localized at the vicinity of the tip of hypoglossal nerve axons. The analysis of gene expression and protein localization revealed that Cxcl12 and Cxcr4 signals, which originated from tongue myogenic cells and blood capillaries, may act as the axon guidance factors of the hypoglossal nerve.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 形態系基礎歯科学

キーワード：歯学 病理学 舌発生 血管・神経網 筋細胞系譜 軸索誘導 ガイダンス因子

1. 研究開始当初の背景

成体における全身の諸臓器・器官では、血管網と神経網は互いに相似した走行・分枝パターンを構築して機能的に連携している。この成熟した血管網と神経網を構築する発生段階において、血管系細胞と神経系細胞は互いに連動しており、共通するガイダンス(誘引・反撥)シグナル(Semaphorins, Slits, Ephrins, Netrins、ケモカイン・増殖因子およびそれらの受容体)が働いている。特に、ガイダンスシグナルに対しては伸長する血管先端部に位置する Tip 細胞と神経軸索の先端部(成長円錐)が応答している(Adams & Eichmann, 2010)。さらに、器官特異的な血管網と神経網の構築に向けては、ガイダンスシグナル回路におけるリガンド-受容体の組み合わせの多様性、さらには周囲組織の構成細胞(血管内上皮細胞や神経堤細胞、血管平滑筋細胞・ペリサイト・グリア細胞など)によるガイダンス機能も注目されている(Guthrie, 2007、Minoux ら, 2010)。

発生初期の顎顔面領域では、左右側の突起間癒合を経て形態形成が進行するが、体節・神経管から発生した血管網と神経網は左右対称性を維持しながら鰓弓・突起先端部まで伸長する。第2-4鰓弓由来の組織複合体である舌の形態形成では、癒合直後の下顎突起背側での外側舌隆起の発生に始まり、背側動脈から分岐した鰓弓動脈の発達と末梢血管網の分枝、舌運動支配の舌下神経や味覚を司る顔面・舌咽神経の軸索伸長をとまなっている。

2. 研究の目的

本研究では、マウス舌下神経軸索の伸長経路は後頭体節由来の舌筋前駆細胞の移住経路と一致することを実証し、舌下神経軸索の伸長方向を制御するガイダンスの分子機構の解明を目指した。この目的に向けて、多重免疫標識法により3次元組織空間における神経軸索・血管内皮・筋系細胞の局在を同時観察できる方法を確認し、顎顔面全域での血管網・神経網の発達過程を捉えた。次に、顎顔面領域を支配する5つの脳神経軸索(三叉・顔面・舌咽・迷走・舌下神経)を識別するマーキング画像処理を導入することによ

り、3次元組織空間での個々の神経軸索の伸長過程を可視化した。さらに、伸長途上にある舌下神経の軸索先端と筋細胞系譜との空間的な位置関係を免疫組織化学により検証するとともに、DNAマイクロアレイデータと Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析に基づき、舌下神経の軸索誘導に働くガイダンス候補因子について検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と胎仔採取

実験動物として ICR 妊娠マウス(日本チャールズリバー)を使用し、所定の妊娠時期まで日本歯科大学共同利用研究センター生物科学施設で飼育した。すべての動物管理は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会のガイドラインに従った。プラグ確認時の朝9:00を胎生0.5日として、胎生9.5~11.5日の胎仔試料を採取した。試料採取に際しては、妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、子宮内から胎仔を摘出した。胎仔の発育段階は Theiler 分類に基づき確認した。

(2) 組織観察標本の作製と多重免疫標識

パラフィン組織標本については、摘出した胎仔試料を4%PFA(0.1 M PBS)で24時間固定、パラフィン包埋後、前頭断ならびに矢状断の連続薄切標本(4 μm厚さ)を作製した。免疫染色では、局所の組織観察には蛍光抗体法を、組織立体構築のためには酵素抗体法を用いた。神経マーカとして Gap43 (Sigma) と Pgp9.5 (Abcam) のカクテル抗体、血管マーカ Pecam1 (Santa Cruz)、筋細胞系譜マーカ Desmin 抗体 (Invitrogen) を用いた。抗原基の賦活化には EDTA-Tris 緩衝液での湯煎処理を施した。蛍光抗体法では、蛍光標識した二次抗体 (Alexa Fluor) を反応させ、DAPI で核染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS-NT、Leica) による観察に供した。酵素抗体法では、H₂O₂ による内在性ビオチンの不活性化と5%スキムミルクによるブロッキング後に一次抗体を4℃で一晩反応させた。ビオチン化二次抗体を室温で1時間作用させた後、ABC法にて検出した。これらの免疫標識標本については、試料全域の画像情報をバーチャルスライド (Nanozoomer、浜松ホトニ

クス)により高解像度のデジタル情報として記録した。

(3) 免疫標識要素の分画と組織立体構築

胎生 9.5 日、10.5 日、11.5 日の胎仔頭部顔面領域における多重標識した矢状断または前頭断の連続薄切標本(150~600 枚)から組織立体構築を行った。すべての連続薄切標本から記録された VS 画像から RGB 色調に基づき血管内皮、神経軸索および胎仔の組織輪郭を抽出し、隣接する標本間での空間座標を順次合わせることで、胎仔組織空間での血管網と神経軸索走行を立体表示した。次に、

顎顔面領域で複雑な走行を示す三叉神経・顔面神経・舌咽神経・迷走神経・舌下神経を個別に立体表示する目的で、連続する VS 画像上でマニュアル操作により該当する神経軸索と血管の断端にラベリング情報を付加し、これらのラベリング情報を組織立体空間で分画した神経軸索および血管に重ね合わせた。以上の 3 次元形態観察においては、連続画像間の位置合わせと RGB 色調による組織要素の分画には ImageJ (NIH)、分画要素の 3 次元観察と解析には VG Studio Max (ビジュアルサイエンス)を使用した。

(4) 遺伝子発現プロファイルの解析

各胎齢時期でプールした下顎突起正中部の組織試料から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析には GeneChip® (Mouse Genome 430 2.0 Array、Affymetrix) と GeneSpring GX7.3.7 (Agilent Tech.)を用いて、部位/時期特異的な発現を示す遺伝子リストを作成した。IPA を使用して、GO 分類による生物学的機能を推定、遺伝子間の相互位置とハブの機能を果たす遺伝子を探索、遺伝子ネットワークの構築を行った。これらの解析に基づいて候補に挙げた神経軸索誘導に関わる特異的な遺伝子発現を確認する目的では、特定部位の細胞集団を Laser-capture microdissection (LMD) 装置により顕微切断し、バルク組織試料と同様に遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量解析した。

4. 研究成果

(1) マウス鰓弓での血管網と神経網の発達

免疫組織化学による光顕観察では、胎生 9.5

日においては、心臓や背側動脈、大動脈弓、主静脈などの主要な血管構造の発達に加えて、鰓弓・下顎突起領域にも Pecam1 陽性の内皮細胞で構成された微小血管網の先端が到達していた。この発生時期には脳神経軸索は観察されず、胎生 10.5 日になって背側側方部から伸長してきた脳神経軸索が鰓弓の入り口付近まで伸長した。胎生 11.5 日では、外側舌隆起にも微小血管網が発達しており、舌下神経を含む脳神経軸索が鰓弓内部にまで伸長していることも確かめられた。

(2) 血管・神経発達の組織立体観察

バーチャルスライドによる高画質デジタル情報を活かした組織立体構築法に基づき、まず、胎生 9.5 - 11.5 日の ICR マウス胎仔頭部全域に広がる血管網と神経網を復元した(図 1)。胎生 9.5 日の胎仔試料の立体構築像では、第 1 鰓弓(上顎突起と下顎突起)、第 2 鰓弓および第 3 鰓弓を明瞭に区別することができ、血管構造として心臓、頭尾軸に沿った背側動脈と等間隔で分岐している節間動脈、鰓弓に向けて走行する第 1~3 大動脈弓が観察できた。静脈系の血管走行としては、腹部の太い総主静脈と尾部の臍静脈を同定できており、これらの静脈は動脈に比べて太く、管腔形状は不規則であった。この発生時期においては、末梢血管網は発達途上であり、鰓弓・下顎突起領域での血管密度は低い状態にとどまっていた。

胎生 10.5 日の鰓弓・下顎突起では、内頸動脈などから分岐した微細な血管網が構築されており、神経管や神経節から起始した脳神

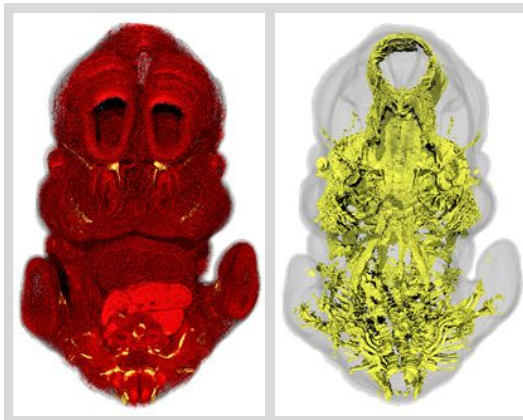


図1 胎生11.5日マウス胎仔のPecam1とGap43/Pgp9.5の二重免疫標識に基づく組織立体構築像(正面観)。血管は赤色、神経は黄色の類似カラーで表示。左図は神経成分のみを分画・表示している。

神経軸索が伸長していた。水平断面あるいは前頭断面の観察により、下顎突起内部には微細血管網が表皮直下まで構築されていたが、神経軸索は下顎突起には到達していないことが確認できた。胎生 11.5 日では、血管網が発達し、神経軸索の伸長が継続されていた。上顎突起と下顎突起では構築された微細な血管網の改築が進み、突起内部で部位による血管密度の濃淡や血管走行の規則性も認められるようになった。特に、下顎突起正中部に識別される外側舌隆起の側方部では密集した血管網も観察された。

(3) 脳神経軸索の分画と組織立体観察

次いで、神経軸索のラベリング処理に基づき、胎生 10.5 日と胎生 11.5 日の立体構築像に伸長する 5 つの脳神経(三叉・顔面・舌咽・迷走・舌下神経)を異なる色調で立体表示することにより、以下に述べる神経起始部から軸索先端までの走行を辿ることが可能となった(図 2)。

三叉神経：胎生 10.5 日に三叉神経節から分岐する眼神経・上顎神経・下顎神経の 3 つの主枝を辿ることができた。眼神経は眼原基(眼杯)に連結するような走行を示した。上顎神経と下顎神経は複数の軸索束を成してそれぞれ上顎突起・下顎突起側方部を遠心方向へ伸長し、胎生 11.5 日に至ると、いずれの神経枝も鰓弓上皮直下まで達し、それぞれの軸索先端部は細かく分岐して広がっているのが詳細に観察できた。この上顎神経と下顎神経はそれぞれ上顎動脈と下顎動脈と併走しているのが確かめられた。なお、下顎神経は下顎突起の基部で舌神経と下歯槽神経に分岐することも確認できた。

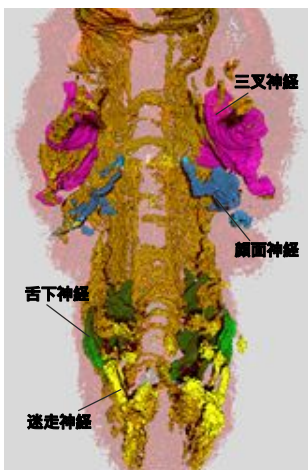


図2 胎生10.5日マウス胎仔の顎顔面領域に伸長してきた三叉神経・顔面神経・迷走神経・舌下神経。

顔面神経：胎生 10.5 日で起始した顔面神経は第 2 鰓弓に向けて伸長する太い

神経軸索のほか、上顎突起に向かう軸索と下顎突起に向かう軸索の走行を辿ることができた。上顎突起に向かう神経は突起内部において三叉神経からの神経枝と交通することも捉えられた。胎生 11.5 日になると、下顎突起に向かう軸索は下顎突起領域に入りこみ、鼓索神経として外側舌隆起に達し、三叉神経由来の舌神経と近接・併走することも確認できた。

舌咽神経：胎生 10.5 日において第 3 鰓弓の背側に位置する舌咽神経節の上神経節または神経管を起始点として、味覚枝と咽頭枝の 2 つの神経枝に分岐し、咽頭枝は原始咽頭に沿って上行し、胎生 11.5 日になると、鰓下隆起の上皮下に到達する。これらの神経枝とは別個に、舌咽神経節から発した細い分枝が上行して顔面神経枝と交通することも確かめられた。

迷走神経：胎生 10.5 日に第 4 鰓弓背側下方にある迷走神経節(下神経節)から起始した比較的太い神経は第 3~4 鰓弓の基部付近で舌下神経および脊髄神経と交錯して複雑に走行し、胎生 11.5 日には、第 4 鰓弓へ伸長する神経枝と、喉咽頭方向へ伸長する上喉頭神経・咽頭枝に分岐することも明確に観察することができた。

舌下神経：胎生 10.5 日に延髄予定領域の菱脳から複数の後頭神経根が起始し、これらの神経根が集まって比較的太い共通幹(舌下神経の軸索束)を形成し、第 4 鰓弓の基部付近の迷走神経節下で屈曲した後に、上方正中へ向けて伸長し、第 3 鰓弓から第 2 鰓弓の中央部を経由して第 2 鰓弓と下顎突起の境界部付近まで到達することが明瞭に捉えられた。舌下神経軸索は部分的には節間動脈・鰓弓動脈と併走しているようにみえたが、ある程度の距離を置いて両者が走行していることが確認できた。胎生 11.5 日になると、舌下神経軸索は下顎突起の下部から突起内部に伸長し、外側舌隆起直下で細かく分岐することも観察できた。

(4) 舌下神経軸索・血管内皮・筋細胞系譜間の位置関係とガイダンス作用

後頭体節由来の舌筋前駆細胞は集団を成して移住し始め、体幹間充織・各鰓弓を経由

して胎生 10.5 日には下顎突起正中部の舌予定域に到達した。この舌筋前駆細胞の移住経路は、先に示した舌下神経の伸長経路と類似しており、実際、神経マーカと筋系譜マーカとの二重免疫染色による解析では、胎生 10.5 日で後頭神経根から起始した舌下神経の軸索は後頭体節近傍の体幹間充織内で、先行する舌筋前駆細胞の集団と合流し、胎生 11.5 日になると、集団で移住する舌筋前駆細胞のなかを接触しながら伸長し、下顎突起背側正中部の外側舌隆起直下にまで到達するのが観察された。この時期の鰓弓内では、舌下神経と併走する比較的太い血管はみられなかったが、軸索先端部の内部および周囲に比較的細い血管が取り巻いているのが確認できた。

これらの組織所見を踏まえて、神経・血管・筋に着目した IPA 解析・定量発現解析・組織内局在の解析を実施した。その結果、IPA 解析で神経ガイダンス因子として抽出された *Netrin1*, *Cxcr4*, *Ngfr* は、定量発現解析でも胎生 10.5 ~ 11.5 日にかけて顕著な発現上昇を示した。これらは舌下神経の軸索誘導因子の候補として注目された。これらの遺伝子(分子)のうち、*Cxcr4* の組織内局在の解析では、一部の神経軸索と舌筋細胞、ならびに舌筋細胞集団周囲の血管に陽性反応がみられた。*Cxcr4* のリガンドである *Cxcl12* は軸索内の単核の陽性細胞と弱陽性の舌筋細胞のほかに、強い陽性反応を示す多くの血管内皮細胞が観察された。以上の結果から、舌下神経・舌筋細胞・血管内皮細胞間でのガイダンス作用が示唆された。

(5) まとめ

本研究では、胎生 9.5 - 11.5 日の ICR マウス胎仔における血管網と神経網の組織立体構築を行い、両者の空間的位置情報を得ることができた。立体画像上での脳神経のマーキング処理により、舌支配に関わる多くの神経軸索は神経堤細胞の移住経路を追走するように神経管や神経節から近傍の鰓弓に至る短距離を伸長するのに対して、舌下神経軸索は胎生 10 日前後に後頭神経根から起始して、複数の鰓弓を経て舌原基に至る長距離を約 24 時間で伸長することが明瞭に観察できた。この舌下神経軸索は後頭体節から集団を成

して移住している舌筋細胞系譜と接触しながら伸長し、その伸長経路は舌筋細胞系譜の移住経路と重なることが実証できた。この舌下神経の軸索伸長では、血管だけでなく舌筋細胞系譜からのガイダンス作用が示唆された。今後の課題として、舌下神経軸索のガイダンス機構の解明に向けて、軸索誘導に特異的に働く遺伝子の機能と上流・下流に位置する分子を含む分子ネットワークを解明することが重要と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Fujita K, Taya Y, Shimazu Y, Aoba T, Soeno Y: Molecular signaling at the fusion stage of the mouse mandibular arch: involvement of insulin-like growth factor family. *Int J Dev Biol* (査読有), 57: 399-406, 2013.

[学会発表](計 11 件)

田谷雄二, 藤田和也, 添野雄一, 島津徳人, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌形態形成におけるリンパ管発生と分子制御, *J Oral Biosci.* 55(Suppl):128 (No.O-84), 2013.

島津徳人, 田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 佐藤かおり, 青葉孝昭: 脈管構造の組織立体構築と Virtual Reality 観察, *J Oral Biosci.* 55(Suppl):110 (No.O-14), 2013.

島津徳人, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 田谷雄二, 中右かよ, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌脈管ネットワークの組織立体構築と仮想空間での動的観察. *日本解剖学会抄録集*, 75(1):102, 2013.

Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, and Aoba T: Three-dimensional comprehension of developing blood vessel and nerve networks in the craniofacial region of mouse embryos. *日本解剖学会抄録集*, 75(1): 151, 2013.

Fujita K, Soeno Y, Taya Y, Shimazu Y, Sato K, and Aoba T: Myoblast-differentiation and mRNA/miRNA expression in developmental mouse tongue, PROGRAM BOOK 41st Annual meeting & exhibition of the American Association for Dental Research, p.71 (No. S0586), 2012.

Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Three-dimensional visualization of developing vascular-nervous networks in embryonic mice, 2012 Sino-Japan Dental Conference Proceedings: p99 (No.00087), 2012.

Taya Y, Shimazu Y, Fujita K, Soeno Y, Sato K, Aoba T: Embryonic morphogenesis and organization of vascular and nervous networks in mouse craniofacial region, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Program & Abstract Book: 176 (P1-124), 2012.

田谷雄二, 島津徳人, 佐藤かおり, 藤田和也, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス舌発生における舌筋前駆細胞の移住は舌下神経の軸索誘導に働く, J Oral Biosci, 54(Suppl): 106 (No.O-91), 2012.

田谷雄二, 藤田和也, 島津徳人, 佐藤かおり, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス顎顔面領域における器官発生の分子制御: 下顎突起癒合期における脈管網・神経網の構築, J.Oral Biosci. 53(Suppl):180 (No.P2-32), 2011.

藤田和也, 田谷雄二, 佐藤かおり, 島津徳人, 添野雄一, 青葉孝昭: マウス舌初期発生における筋芽細胞分化のタイミングと遺伝子発現制御, J.Oral Biosci., 53(Suppl):181 (No.P2-37), 2011.

藤田和也, 添野雄一, 田谷雄二, 島津徳人, 佐藤かおり, 青葉孝昭: マウス舌初期発生と筋芽細胞分化の分子制御: miRNA・タンパク質の発現局在, 第 34 回日本分子生物学会年会

MBSJ2011 プログラム, p.189 (No.1P-0130), 2011.

[図書] (計 1 件)

佐藤かおり (編集): 日本歯科大学 病理学講座編 (青葉孝昭 監修): 歯学生のための最新・病態病理学入門、株式会社キタ・メディア, 東京, 2014 年, ISBN No. 978-4-907832-17-9.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 かおり (SATO KAORI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 9 0 2 8 7 7 2

(2) 研究分担者

田谷 雄二 (TAYA YUJI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 3 0 1 9 7 5 8 7

添野 雄一 (SOENO YUICHI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 7 0 3 5 0 1 3 9

島津 徳人 (SHIMAZU YOSHIHITO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 1 0 2 9 7 9 4 7

青葉 孝昭 (AOBA TAKAAKI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号: 3 0 0 2 8 8 0 7

(3) 連携研究者

()

研究者番号: